на поврежденную конечности, мы наблюдали лишь на 26-27 сутки после операции.

Заключение

Применение стягивающих полос с ограниченным контактом для фиксации отломков способствовало восстановлению функции опоры и движения у собак после операции в среднем на 5 суток раньше по сравнению с собаками, у которых фиксацию отломков проводили дополнительно интрамедуллярным фиксатором. Фиксация отломков с применением лишь стягивающих полос возможна у кошек и собак с массой до 20 кг. В данном случае необходимо также учитывать темперамент животного. Так, у собак с подвижным темпераментом и допустимой массой при косых переломах трубчатых костей следует сочетать вышеприведенный накостный фиксатор с интрамедуллярным остеосинтезом.

SUMMARY

The injured bones integrity rehabilitation was carried out in the combination with the intramedullary osteosynthesis with the constringent bands having a confined contact with the bone tissue as well as the imposition of such bands. Osteosynthesis with the application of the constringent bands only is characterized by the support function rehabilitation of the operated dogs five days earlier (on average) in comparison with the dogs whose bone fragments fixation was canned out additionally with the intramedullary clamp.

Литература:

1 Молоканов В.А., Кирсанов К.П., Чернигов Ю.В, Лечение травматических вывихов тазобедренного сустава у мелких домашних животных. М. «КолосС», 2005, С. 19-20.

2. Тимофеев СВ., Филиппов Ю.И., Бахтинов В.А. и др. Лечение открытых диафизарных переломов костей голени у кошек// Ветеринария. 2006. № 2, с. 151-62.

3. Шанко-Шайковский *А.Т.* Основы построения металлополимерных конструкций биотехнических систем для остеосинтеза // Ортопедия, травматология и протезирование. 2000. №1. С. 45-48.

ЕР. Агамян, ИМ. Симовян, А.А. Арутншян, ЕМ. Симонян, М.А. Симонян, А.А. Ешоян

(Институт биохимии им. ГБунятяна НАН. РА)

ЭФФЕКТ ВНУТРИБРЮЩИННО ВВЕДЕННОГО БОГАТОГО ПРОЛИНОМ ПОЛИПЕПТИДА НА АКТИВНОСТЬ ИЗОФОРМ ЦИТОХРОМА Ь558 ТКАНЕЙ БЕЛЫХ КРЫС

Синтетический аналог богатого пролином нолипеитида БПП-1, открытого А.Талояном и сотр. в низких концентрациях обладает способностью улавливания высокотоксичных гидроксильных радикалов (НО.) in vitro, однако при концентрации выше 80 мкг этот полипептид уже стимулирует продуцирование этих радикалов [4,8]. Путем улавливания НО-радикалов БПП-1 предотвращает дезактивирование (деградирование) ряда металлопротеинов антиоксидантной активности - МАА (Си^п-СОД, каталаза, церулоплазмин) и металлопротеинов прооксидантной активности - МПА (новые изоформы цитохрома Ь-558 из эритроцитарных мембран) in vitro. Изоформы цитохрома (цит) Ь558 являются кофакторами для НАДРН-зависимых оксидаз и участвуют в процессе продуцирования супероксидных радикалов (O_2^-) фагоцитирующими лейкоцитами, в мембранах которых локализованны эти ферменты [7,6]. Причем в составе молекулы цит Ь558 имеется пролином богатый полипептид (по первичной структуре отличается от БПП-1), который играет ключевую роль для сохранения стабильности и активности этих гемопротеинов [9]. Недавно был открыт феномен регулирования цитокинами экспрессии НАДРН-зависимых оксидаз, ключевых компонентов иммунной системы организма [7]. По своему характеру БПП-1 также является цитокином, обладающим иммунномодуляторным и антистрессорным эффектом [4]. Оказывается, что НАДРН-зависимые супероксид-продуцирующие оксидазы локализованы не только в мембранах (в цитозоле) форменных элементов плазмы (лейкоциты, лимфоциты, моноциты и др.), но и в мембранах эндотелиальных клеток человека и клеток гладких мышц сердца крыс (6,5). По предварительным результатам БПП-1 повышает метгемоглобин (мет-НЬ)-восстанав-

ливающую активность цит Ь558Шиз эритроцитарных мембран (ЭМ), как в гомогенной, так и в гетерогенной фазах в ЭМ) in vitro (3). В настоящее время фракция нового изоформа цит Ь558 получается и из мембран клеток органов, ответственных за иммунитет организма (селезенка, костный мозг и тимус), с использованием ранее разработанного биотехнологического способа [1]. Такая фракция цит Ь558 также обладает НАДРН-зависимой супероксид-продуцирующей и метНЬ-восстанавливающей активонстями (как это свойственно цит Ь558Ш ЭМ) [3], а БПП-1 в большинстве оказывает стимулирующий эффект на эти активности. Однако указанные эффекты БПП-1 на активности цит Ь558 были определены в условиях in vitro, а вопрос о механизмах действия БПП-1 in vivo остается еще нерешенным.

Целью работы являлось определение механизмов влияния внутрибрюшинно введенного БПП-1 на НАДРН-зависимую супероксид-продуцирующую и метНЬ-восстанавливающую активности цит Ь558Ш ЭМ, а также фракции цит Ь558 из мембран клеток (МК) селезенки, костного мозга и тимуса крыс в гомогенной и гетерогенной фазе (в ЭМиМК).

Материалы и методы

В опытной группе белым половозрелым здоровым крысам (12 животных) весом 200-250 г было внутрибрюшинно введено по 10мкг/мл БПП-1 (всего три раза через каждые двое суток). Фактически концентрация БПП-1 после введения в кровь крыс уменьшалась около 5 раз, если учесть то обстоятельство, что в организме крыс имеется около 5-6 мл кровь. Контрольным животным был введен физиологический раствор в аналогичном режиме (по 0,5 мл). Крысы были декапитированы под легким эфирным наркозом и кровь стабилизировали 2% оксалатом натрия в условиях легкого перемешивания в ходе набора крови. Из крови опытной и контрольной группы (по 35 мл) былы получены ЭМ и цит Ь558Ш. Одновременно былы взяты ткани (костный мозг - 5 мл, тимус - 2 г и селезенка - 10 г). Цит Ь558Ш ЭМ и фракцию цит Ь558 из этих тканей получали биотехнологическим способом [1], без использования детергента, который дестабилизирует эти белки. Фракцию цит ЬЬ558 из мембран клеток тканей получали путем гомогенизирования последних в 0,04 М кфлий фосфатном буфере, pH 7,4 (КФБ), После 24 ч хранения при -10° и размораживания гомогената его центрифугировали и осадок промывали этим же буфером до получения бесцветного супернатанта. Этот осадок смешивали с КФБ и обрабатывали процедурой, указанной в этом лицензированном способе, в результате чего получали водорастворимые фракции цит Ь558 (по 20 мл) из МК селезенки, костного мозга и тимуса с плотностью характерного максимального оптического поглощения при 530 нм (бета полоса поглощения) 0,5,0,1 и 0,04 соответственно. При этом пробы очищенных ЭМ и МК селезенки, костного мозга и тимуса (по 10 мл, смешанные с 0,04 М КФБ) отделяли для определения 0_2-продуцирующей и метгемоглобин (метНЬ)-восстанавливающей активности цит Ь558 в гетерогенной фазе. 0_2-продуцирующую активность цит Ь558 определяли нитротетразолиевым синим (НТС) методом путем вычисления процента стимулирования образования формазана (при 560 нм) в результате восстановления НТС супероксидными радикалами. За единицу 0_2-продуцирующей активности цит Ь558 принимали то количество белка, которое способно стимулировать образование формазана на 50%. МетНЬ-восстанавливающую активность цит Ь558 определяли используя свежеполученный метНЪ (ферриНЬ) крови крыс. При этом величина оптического поглощения альфа-полосы (при 565 нм) метНЬ составляла 0,9, а величина поглощения бета-полосы используемого цит Ь558 из ЭМ или из МК указанных тканей (при 530 нм) в реакционной смеси составляла 0,05. Непосредственно в кварцевых кюветах спектрофотометра к 3 мл раствора метНЬ добавляли 0,2 мл цит Ь558Ш ЭМ или фракцию цит Ь558 МК тканей или 0,2 мл ЭМ или МК, смешанных с 0,04 М КФБ. После быстрого перемешивания реакционной смеси ее инкубировали в покое в аэробных условиях in vitro в течение 15-16 ч при 30°. После повторного перемешивания реакционной смеси определяли кинетику восстановления метНЬ до ферроНЬ путем измерения снижения интенсивности плотности альфа-поглощения метНЬ. Это снижение прямо пропорционально образовавшемуся ферроНЬ, который имеет максимальное оптическое поглощение при 555 нм.

Оптические спектральные измерения осуществляли на спектрофотометре «Specord UV-VIS» (Германия) с длиной оптического пути 1 см.

Статистическую обработку полученных результатов осуществляли методом вариационной статистики Стьюдента-Фишера с определением критерия достовер-

Таблица

Относительное изменение (%) уровня и активности цит Ь558Ш ЭМ и фракции цит Ь558 МК органов крыс под влиянием внутрибрюшинновведенного БПП-1 по сравнению с 100%-ными контрольными показателями (Р< 0,05, п = 8).

Цит Ь558	1	2	3
Цит Ь558Ш из ЭМ +гомогенная фаза)	- 50,6 +/- 4,1	+45,4 +/-3,9	-47,3 +/-4,6
Цит Ь558 в ЭМ (гетерогенная фаза)	-34,2 +/- 5,0	+26,6 +/- 3,8	-
Фракция цит Ь558 из МК селезенки (гомогенная фаза)	-24,3 +/-2Д	+31,4 +/-3,2	-23,3 +/-2,5
Фракция цит Ь558 в МК селезенки (гетерогенная фаза)	-8,9 +/-0,7	+21,6 +/-3,0	-
Фракция цит Ь558 из МК костного мозга (гомогенная фаза)	-15,2 +/- 0,4	+ 53,7 +/- 6,0	+4,7 +/- 0,3
Фракция цит Ь558 в МК костного мозге (гетерогенная фаза)	-8,2 +/- 0,9	+ 33,5 +/- 6,2	-
Фракция цит Ь558 из МК тимуса (гомогенная фаза)	- 6,3 +/-0,2	+14,5 +/-2,2	+ 15,3 +/- 3,8
Фракция цит Ь558 в МК тимуса (гетерогенная фаза)	-11,9 +/-1,4	+12,3 +/- 2,0	-

Примечание: 1 - НАДРН-зависимая супероксид-продуцирующая активность , 2 - метНЬ-восстанавливающая активность, 3 - уровень

ности (Р).

Результаты и обсуждение

В результате трехразового внутрибрюшинного введения крысам по **10** мкг БПП-1), наблюдается существенное снижение НАДРН-зависимой супероксид-дродуцирующей активности цит Ь558Ш ЭМ, особенно в гомогенной фазе. При этом заметно повышается метНЬ-восстанавливающая активность цит Ь5581П, на фоне снижения его уровня (таблица). БПП-1 стимулирует НАДРН-зависимую супероксид-продуцирующую активность в концентрациях до 7-8 мкг/мл и снижает ее выше этой концентрации in vitro. Получается, что эта закономерность сохраняется и in vivo. Механизм снижения уровня цит Ь558Ш из ЭМ под влиянием БПП-**1** in vivo возможно связан с повышением степени агрегации цит Ь558 в ЭМ, затрудняющий процесс солюбилизации цит Ь558 из ЭМ. С другой стороны, возможны и качественные изменения цит Ь558Ш в результате «прихватки» БПП-1. Напомним, что БПП (но не БПП-1) является компонентом молекулы цит Ь558, а последний, видимо, является рецептором БПП-1 [9]. С другой стороны, БПП-1 подавляет процесс самоотщепления (рилизинг) цит Ь558 из ЭМ и этим путем снижает степень гемолиза эритроцитов и повышает стабильность ЭМ **[2].** Направленность изменений НАДРН-зависимой супероксид-продуцирующей и метНЬ-восстанавливающей активности цит Ь558 в гетерогенной фазе (в ЭМ) сохраняется под влиянием БПП-1 in vivo, хотя эти изменения в ЭМ происходят с повышенной амплитудой почти в **2** раза (таблица).

Направленность изменений НАДРН-зависимой супероксид-продуцирующей и метНЬ-восстанавливающей активности фракций цит Ь558 из МК селезенки, костного мозга и тимуса под влиянием экзогенно введенного БПП-1 in vivo сохраняется. То есть наблюдается снижение НАДР-зависимой суиер-продуцирующей активности фракции цит Ь558 и повышение метНЬ-восстанавливающей активности этих фракций из МК тканей под действием БПП-1 in vitro. Такое повышение метНЬ-восстанавливающей активности характерно особенно для фракции цит Ь558 из МК костного мозга и селезенки. Причем уровень фракции цит Ь558 в костном мозге и, особенно, в тимусе несколько повышен. Механизм такого повышения пока трудно интерпретировать.

Заключение

Механизмы действия БПП-1связаны со снижением НАДРН-зависимой супероксид-продуцирующей и увеличением метНЬ-восстанавливающей активности цит Ь558Ш ЭМ и фракций цит Ь558 МК органов, ответственных за иммунную защиту организма (костный мозг, селезенка и тимус), а направленность этих изменений в основном сохраняется in vitro, и in vivo в гомогенной и гетерогенной фазах. Возможно эти изменения связаны с улавливанием БПП-1 НО-радикалов и «увеличением» уровня внутримо-

пекулярного БШТ в молекуле цит Ь558, за счет БПП-1. Не исключается, что цит Ь558 действует как рецептор экзогенного БПП-1 не только в ЭМ, но и в МК приведенных органов.

Можно предполагать, что эритроциты также участвуют в иммунной защите организма, наряду с клетками селезенки, костного мозга и тимуса, как цит Ь558-содержащие и улучшающие кислородный гомеостаз системы. При этом метНЬ -восстанавливающая активность является характерной чертой не только цит Ь558Ш ЭМ, но и цит Ь558 иммунных клеток, подчеркивая связь иммунной защиты с кислородным гомеостазом.

SUMMARY

The changes of the level and activity of new isoforms of cytochrome b558 in tissues including in immune protection and in erythrocytes membranes of the rats under the influence of intraperitoneally injected proline-rich polypeptide

The mechanisms of influence of the intraperitoneal injection of rats by proline-reach polypeptide (PRP-1) three times to 10 mkg during 10 days on the state of prooxidarive activity metalloproteins in vivo are connected with the decrease of NADPH-depending superoxide-producing and increase of methemoglobin (metHb)-reducing activities of new isoforms of cytochrome (cyt) bS58HI from erythrocytes membranes (EM) and fraction of cyt. b558 from cells membranes (CM) of the tissues, including in immune protection (bone marrow, spleen, thymus). It is supposed, that these effects of PRP-1 are connected with the chelation of HO-radicals, and the «elevation» of the level of endogenous proline-rich polypeptide in the content of the cyt b558 molecule, as a receptor of exogenous PRP-1.

Thus, the metHb-reducing activity characterized cyt b558 of above indicated CM tissues, which is testified about the including of erythrocytes in immune protection, which is connected with the oxygen homeostasis.

Литература:

1. Симонян М.А., Симонян *Т.Ы.,* Симонян ЕМ. Способ получения цитохромов b из эритроцитарных мембран. Лицензия изобрет.Ко 908 Армпатента, Ереван, 2001.
2. Симонян Р.М., Симонян Г!М., Бабаян М.А., Симонян М.А. и Галоян А.А. Транслокация цитохрома Ь558 из мембран эритроцитов интактной и облученной Х-лучами крови при их инкубировании in vitro.Подавление этого процесса препаратами антиоксидантного действия. Мед наука Армении, 2003, XUH(3), 13-18.
3. Симонян РМ., Симонян ГМ., Бабаян М.А., Симонян М.А. Х-облучснис эритроцитарных мембран и цитохрома Ь558Ш in vitro стимулирует агрегацию последнего и снижает его супероксид-продуцирующую и мстгсмоглобин-восстанавливающую активность. Мед.наука Армении, 2004, XLIV(l), 43-46
4. Gaioyan A.A. Brain Neurosecretory cytokines; Immune Response and Neuronal Survival Klumer Academic/Plenium Publishers. N.-Y, 2004,188p.
5. FukuiT, Lassegue B., Kai H. et al. Cytochrome b558 alpha-subunit cloning and expression in rat aortic smooth muscle cells. Biochim.Biophys Acta 1995, 1231(3), 215-219.
6. JonesS.A.,0'DonnelVB.,WoodJ.D.,etal. Expression of phagocyte NADPH oxidase components in human endotelial cells. Am. J.Physiol., 1996,271(4 pt 2),H1626-H1634.
7 Kalinina N., Agrotis A., Tararak E. et al. Cytochrome b558 -dependent NADPH oxidase-phox units in smooth muscle and macrophages of atherosclerotic lesions. Aterioscler.Thromb.Vasc.Biol., 2002,22(12), 2037-2043.
8. Knaryan VH., Samanatary S., Gaioyan A.A., Mohanakumar K.P A synthetic human proline-rich polypeptide enhances hydroxyl radical genegation and fails to protect dopaminergic neurons against l-methyl-4-phenyl-l,2,3,6-tetrahydropyridine-induced toxicity in mice. Neuroscience Lett., 2005, 375,187-191.
9. Ogura K., Nobuhisa Y, Yazawa S. et al. NMR solution structure of the tandom Scr homology 3 domans of p47 phox complexde with a p22 phox-derived proline-rach peptide. J.Biol.Chem., 2006, 281(6), 3660-3668.

В. А. Агольцов

(ФГОУВПО «Саратовский ГАУ»)

ПОКАЗАТЕЛИ КРОВИ ЖИВОТНЫХ, ВАКЦИНИРОВАННЫХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМИ ПРОТИВОКАНДИДОЗНЫМИ, ПРОТИВОАСПЕРГИЛЛЕЗНЫМИ И ПРОТИВОМУКОРОЗНЫМИ ПРЕПАРАТАМИ

Данные иммунологических, биохимических и гематологических исследований при испытаниях вакцин имеют большое научно-практическое значение. Для разработки средств специфической профилактики инфекционных болезней, в том чис-